



(19) RU<sup>(11)</sup> 2 105 064<sup>(13)</sup> C1  
(51) МПК<sup>6</sup> C 12 N 15/00, 15/70

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96114482/13, 19.07.1996

(46) Дата публикации: 20.02.1998

(56) Ссылки: Рекламный анонс фирмы INVITROGEN, Biotechniques, EURO-EDITION, Jan/Feb. 1996, p.4.

(71) Заявитель:  
Институт молекулярной биологии  
им.В.А.Энгельгардта РАН

(72) Изобретатель: Деев С.М.,  
Язынин С.А.

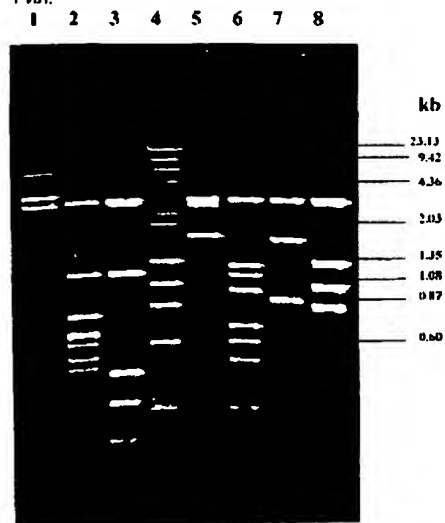
(73) Патентообладатель:  
Институт молекулярной биологии  
им.В.А.Энгельгардта РАН

(54) ВЕКТОР pMT440 С ПОЗИТИВНОЙ СЕЛЕКЦИЕЙ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК

(57) Реферат:

Вектор pMT440 предназначен для использования в генной инженерии для позитивного селективного клонирования фрагментов чужеродной ДНК. Вектор содержит структурный ген барназы, субклонированный из *Bacillus amyloliquefaciens* под контролем синтетического tac промотора, универсальный полилинкер плазмиды pUC19, состоящий из 45 п.о., встроенный в ген барназы вместо валина 36, rhoA - сигнальную последовательность *Escherichia coli*, ген специфического ингибитора барназы - барстара под его собственным промотором, фрагмент плазмиды pUC19, включающий участок начала репликации ori, ген Amp<sup>r</sup>. Сайты рестрикции находятся в следующих положениях от точки начала репликации плазмидной ДНК: EcoR1 - 300 п.о., SacI - 306 п.о., KpnI - 312 п.о., SmaI - 316 п.о., BamHI - 321 п.о., SalI - 333 п.о., PstI - 339 п.о., SphI - 345 п.о., HindIII - 351 п.о. Размер вектора 2936 п.о., емкость - 6 т.п.о. Вектор обеспечивает позитивную

селекцию клонируемых фрагментов чужеродной ДНК в различных штаммах *E. coli*.  
1 ил.



RU 2 105 064 C1

RU 2 105 064 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 105 064** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **C 12 N 15/00, 15/70**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 98114482/13, 19.07.1998

(46) Date of publication: 20.02.1998

(71) Applicant:  
Institut molekuljarnoj biologii  
im.V.A.Ehngel'gardta RAN

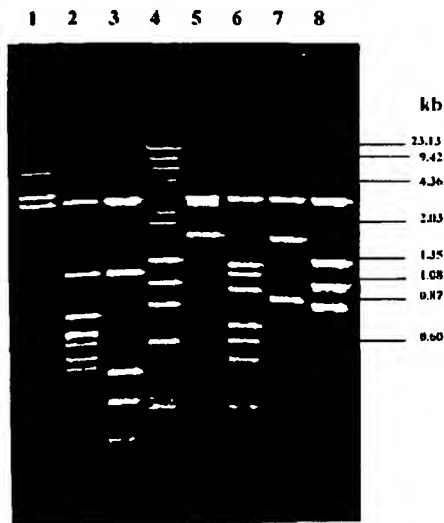
(72) Inventor: Deev S.M.,  
Jazynin S.A.

(73) Proprietor:  
Institut molekuljarnoj biologii  
im.V.A.Ehngel'gardta RAN

(54) **VECTOR PMT440 AT POSITIVE SELECTION FOR FOREIGN DNA FRAGMENTS CLONING**

(57) Abstract:

FIELD: molecular biology, genetic engineering. SUBSTANCE: vector has barnase structural gene subcloned from *Bacillus amyloliquefaciens* under control of synthetic tac-promoter; universal polylinker of plasmid pHC19 consisting of 45 b. p. inserted in barnase gene instead of valine-36; phoA-signal sequence from *Escherichia coli*; gene of specific barnase inhibitor - barstar under its own promoter; plasmid pHC19 fragment including replication start site ori, gene *Amp<sup>r</sup>*. Restriction sites are located at the following positions from replication start point of plasmid DNA, b. p.: Eco RI 300; SacI 306; KpuI 312; SmaI 316; Bam HI 321; SalI 333; PstI 339; SphI 345, and HindIII 351. Vector size is 2936 b. p., its capacity is 6 t.b.p. Vector provides positive selection of cloning fragments of foreign DNA in different strains of *E. coli*. EFFECT: improved method of selection. 1 dwg



RU 2 105 064 C1

RU 2 105 064 C1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности в генетической инженерии, и представляет собой вектор pMT440, который найдет применение для клонирования фрагментов чужеродной ДНК.

В настоящее время для клонирования чужеродной ДНК и идентификации или отбора клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды, существует целый ряд плазмидных векторных систем. Наиболее известные из них - это системы с использованием комплементации  $\beta$ -галактозидазы с цветовой идентификацией клонов со вставкой [1], нокаут гена устойчивости к антибиотику для негативной селекции [1]. Известно о применении токсинов плазмид ColE1 [2] и ColE3 [3] для непосредственного отбора клонируемых вставок, но эта система ограничена небольшим количеством участков узнавания рестриктаз и не получила широкого распространения.

Известна система, основанная на использовании E-гена лизиса фага  $\phi$ X174 [4]. В последней публикации [5] сообщается о замене этого гена на модифицированный ген, содержащий 10 удобных участков узнавания рестриктаз, не изменяющих его аминокислотную последовательность, что скорректировало прежний довольно высокий уровень фона клонов без вставки.

Известен вектор с позитивной селекцией pKIL18/19, содержащий активный цитотоксический ген *ccdB* под контролем *lac* промотора [6]. Продукт этого гена - белок CcdD - инактивирует гиразу в *gusA*<sup>+</sup> штаммах *E. coli*. Но вставка чужеродной ДНК нарушает летальное воздействие гена *ccdB*. Причем сам вектор может быть амплифицирован только в штамме TOP10F, содержащем *gusA*62 мутацию по гену гиразы.

Известен вектор pZEro<sup>TM</sup>, сконструированный на основе pKIL18 [7], при этом он содержит протяженный полилинкер для вставок по *ccdB* гену, T7 и SP6 промоторы, прямой и обратный участки M13, ориджины фага f1 и плазмиды pUC, ген устойчивости к зеоцину. Размер плазмиды снижен до 2,8 т.п.н.

Однако указанный вектор имеет ряд недостатков, а именно он может быть амплифицирован только в одном определенном штамме и характеризуется завышенным количеством балластных клонов за счет того, что полилинкер расположен перед летальным геном, а не внутри него.

В основу изобретения положена задача обеспечения высокоэффективной позитивной селекции клонируемых фрагментов чужеродной ДНК в различных штаммах *E. coli*.

Задача решена тем, что предложено использовать токсический эффект экспрессии в *E. coli* гена бактериальной рибонуклеазы из *Bacillus amyloliquefaciens* - барназы, в векторной системе с позитивной селекцией, содержащей полный мультирестрикционный полилинкер плазмиды pUC19, помещенный внутрь гена барназы без нарушения ферментативной активности экспрессируемого фермента.

Изобретением предлагается вектор pMT440, сконструированный на основе известной плазмиды pMT416, предназначенной для экспрессии высокоактивной рибонуклеазы-барназы, в которой направленно произведены

следующие изменения: а) уничтожены внутренние участки узнавания рестриктазами EcoRI, HindIII, XbaI, PstI, BamHI и б) внутрь гена барназы вместо валина 36 встроены универсальный полилинкер от плазмиды pUC19.

Вектор pMT440 с позитивной селекцией для клонирования фрагментов чужеродной ДНК размером 2936 п.о. содержит

структурный ген барназы, субклонированный из *Bacillus amyloliquefaciens* под контролем синтетического *lac* промотора;

универсальный полилинкер плазмиды pUC19, состоящий из 45 п.о., встроенный в ген барназы вместо валина 36;

*rhoA* - сигнальную последовательность *E. coli*, которая обеспечивает секрецию барназы в периплазму бактериальной клетки;

ген специфического ингибитора барназы - барстара, под его собственным промотором; фрагмент плазмиды pUC19, включающий

участок начала репликации *ori*;

ген *Amp<sup>r</sup>*, определяющий устойчивость к ампициллину в клетках *E. coli*;

сайты рестрикции в векторе pMT440 находятся в следующих положениях от точки начала репликации плазмидной ДНК:

EcoRI - 300 п.о.

SacI - 306 п.о.

KpnI - 312 п.о.

SmaI - 316 п.о.

BamHI - 321 п.о.

Sall - 333 п.о.

PstI - 339 п.о.

SpHI - 345 п.о.

HindIII - 351 п.о.;

встраивание чужеродных генов может проходить по сайтам рестрикции, содержащимся в полилинкере;

емкость встраиваемой ДНК - 6 т.п.о.

Экспрессия гена барстара,

субклонированного в виде тандема с геном барназы в одной плазмиде, необходима для нейтрализации летального эффекта синтеза барназы. Без индукции в штаммах *E. coli*,

несущих *lacI<sup>Q</sup>* ген для суперэкспрессии *lac* репрессора (например JM107, XL1-blue, SURE), плазмиды не является летальной, хотя секретируются значительные количества барназы. Добавление небольших количеств индуктора IPTG увеличивает секрецию барназы, но полная индукция большими количествами индуктора подавляет защиту барстара, и клетки погибают. В таких штаммах

*E. coli*, как HB101, без *lacI<sup>Q</sup>* гена и в отсутствии индуктора плазмиды летальна. В ген барназы вместо кодона валина 36 встроены полилинкер плазмиды pUC19. Эта вставка 19 сильногидрофобных аминокислот в молекулу фермента не нарушает летального воздействия полностью экспрессируемого гена. Полученная в результате плазмиды

pMT440 является удобным селективным вектором клонирования. Интактная либо слигировавшая на себя pMT440 не поддерживает рост трансформированных *lacI<sup>Q</sup>*-негативных штаммов, в то время как бактерии, трансформированные плазмидой со вставкой, выживают.

Вектор pMT440 создан на основе экспрессионной плазмиды pMT416. Для этого: из нее удаляют 5 уникальных участков узнавания рестриктаз (EcoRI, BamHI, XbaI, PstI и HindIII) с помощью разрезания,

следующие изменения: а) уничтожены внутренние участки узнавания рестриктазами EcoRI, HindIII, XbaI, PstI, BamHI и б) внутрь гена барназы вместо валина 36 встроены универсальный полилинкер от плазмиды pUC19.

Вектор pMT440 с позитивной селекцией для клонирования фрагментов чужеродной ДНК размером 2936 п.о. содержит структурный ген барназы, субклонированный из *Bacillus amyloliquefaciens* под контролем синтетического *lac* промотора; универсальный полилинкер плазмиды pUC19, состоящий из 45 п.о., встроенный в ген барназы вместо валина 36; *rhoA* - сигнальную последовательность *E. coli*, которая обеспечивает секрецию барназы в периплазму бактериальной клетки; ген специфического ингибитора барназы - барстара, под его собственным промотором; фрагмент плазмиды pUC19, включающий участок начала репликации *ori*;

ген *Amp<sup>r</sup>*, определяющий устойчивость к ампициллину в клетках *E. coli*; сайты рестрикции в векторе pMT440 находятся в следующих положениях от точки начала репликации плазмидной ДНК: EcoRI - 300 п.о. SacI - 306 п.о. KpnI - 312 п.о. SmaI - 316 п.о. BamHI - 321 п.о. Sall - 333 п.о. PstI - 339 п.о. SpHI - 345 п.о. HindIII - 351 п.о.;

встраивание чужеродных генов может проходить по сайтам рестрикции, содержащимся в полилинкере; емкость встраиваемой ДНК - 6 т.п.о. Экспрессия гена барстара, субклонированного в виде тандема с геном барназы в одной плазмиде, необходима для нейтрализации летального эффекта синтеза барназы. Без индукции в штаммах *E. coli*, несущих *lacI<sup>Q</sup>* ген для суперэкспрессии *lac* репрессора (например JM107, XL1-blue, SURE), плазмиды не является летальной, хотя секретируются значительные количества барназы. Добавление небольших количеств индуктора IPTG увеличивает секрецию барназы, но полная индукция большими количествами индуктора подавляет защиту барстара, и клетки погибают. В таких штаммах *E. coli*, как HB101, без *lacI<sup>Q</sup>* гена и в отсутствии индуктора плазмиды летальна. В ген барназы вместо кодона валина 36 встроены полилинкер плазмиды pUC19. Эта вставка 19 сильногидрофобных аминокислот в молекулу фермента не нарушает летального воздействия полностью экспрессируемого гена. Полученная в результате плазмиды pMT440 является удобным селективным вектором клонирования. Интактная либо слигировавшая на себя pMT440 не поддерживает рост трансформированных *lacI<sup>Q</sup>*-негативных штаммов, в то время как бактерии, трансформированные плазмидой со вставкой, выживают.

дистраивания концов, лигирования и субклонирования, как описано в [1];

вместо GTG кодона аминокислоты валин 36 с помощью сайт-направленного мутагенеза вставляют последовательность GAATTCCAGTCAAAGCTT, кодирующую аминокислоты Glu-Phe-Gln-Ser-Lys-Leu и содержащую участки узнавания рестриктаз EcoRI (GAATTC) и HindIII (AAGCTT), разделенные спейсером из шести азотистых оснований;

шестичленный участок между EcoRI и HindIII замещают на полилинкер плазмиды pUC19, состоящий из 45 нуклеотидных оснований. В полученной в результате этого плазмиде pMT440 ген барназы кодирует 19 добавочных аминокислотных остатков вместо одного остатка валин-36. 19 дополнительных аминокислотных остатков, расположенных достаточно далеко от активного центра молекулы и в большинстве своем гидрофобных, образуют внешнюю петлю, не нарушающую нативной конформации фермента;

последовательность структурного гена барназы со вставкой проверяют секвенированием по Сэнгеру [8].

Пример 1. Вектор pMT440 в качестве вектора клонирования с позитивной селекцией.

Получают библиотеку случайных Sau3A фрагментов для последующей вставки по участку узнавания BamHI, расположенному в полилинкере. С целью ужесточить условия проверки берут молярные количества плазмидного вектора, в 5 - 10 раз превышающие соответствующие количества фрагментов библиотеки. Такие соотношения также должны были уменьшить вероятность мультимерных вставок. Для клонирования используют две фракции фрагментов: размером приблизительно от 600 до 1200 пар оснований и размером от 2000 до 4000 п.о. После лигирования и трансформации электропорацией в *E. coli* получают около 600 колоний в случае меньших вставок и 40 колоний с большими на 100 нг вектора. Проверка гибридизацией на чашках с <sup>32</sup>P меченым олигонуклеотидным зондом показывает, что 97% клонов не содержат восстановленного участка BamHI в полилинкере. Плазмиды, выделенные из 7 клонов, негативных в гибридизационном тесте, все содержат вставки, что подтверждено результатами обработки их рестриктазами (чертеж).

На чертеже приведены результаты электрофореза в 1% агарозном геле плазмид, обработанных рестриктазами EcoRI и HindIII, выделенных из выживших трансформантов штамма *E. coli* HB101.

Плазмидная библиотека генов *B. amyloliquefaciens* была получена лигированием плазмиды pMT440, обработанной BamHI, и фрагментов геномной ДНК *B. amyloliquefaciens*, обработанной Sau3A. Набор фрагментов был получен объединением фракций, содержащих фрагменты размером приблизительно от 2 до 4 т.п.н., взятых от четырех образцов ДНК, отличающихся различной длительностью обработки рестриктазой Sau3A. В качестве стандарта (четвертая дорожка) использовано

по 200 пкг ДНК флага λ, обработанный HindIII и ДНК фага φX174, обработанной HaeIII. Фрагмент векторной ДНК размером 2919 т.п.н. представлен во всех треках. Субклонированные фрагменты содержат от 0 до 9 участков расщепления EcoRI вместе с HindIII.

Источники информации

1. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. Molecular cloning (laboratory manual). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.

2. Ozaki, L. S., Maeda, S., Shimada, K. and Takagi, Y.: A novel ColEI::Tn3 plasmid vector that allows direct selection of hybrid clones in *E. coli*. Gene 8 (1980) 301 - 314.

3. Vernet T., Lau P.C., Narang S.A. and Visentin. A direct-selection vector derived from pColE3-CA38 and adapted for foreign gene expression. Gene 34. (1985) 87 - 93.

4. Henrich B and Plapp R. Use of the lysis gene of bacteriophage φX174 for construction of a positive selection vector. Gene 42 (1986), 345 - 349.

5. Henrich, B., Schmidtberger, B. Positive-selection vector with enhanced lytic potential based on a variant of (φX174 phage gene E. Gene 154 (1995) 51 - 54.

6. Bernard P., Gabant P., Bahassi E.M. and Couturier M. Positive-selection vectors using F plasmid ccdB killer gene. Gene (1994) 71 - 74.

7. Рекламный анонс фирмы INVITROGEN, Biotechniques, EURO-EDITION, Jan/Feb 1996, p. 4.

8. Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972.

#### Формула изобретения:

Вектор pMT440 с позитивной селекцией для клонирования фрагментов чужеродной ДНК размером 2936 п.о. содержащий: структурный ген барназы, субклонированный из *Bacillus amyloliquefaciens* под контролем синтетического tac промотора; универсальный полилинкер плазмиды pUC19, состоящий из 45 п.о. встроенный в ген барназы вместо Валина 36; rho A сигнальную последовательность *Escherichia coli*, которая обеспечивает секрецию барназы в периплазму бактериальной клетки; ген специфического ингибитора барназы-барстара, под его собственным промотором; фрагмент плазмиды pVC19, включающий участок начала репликации ori; ген Amp<sup>r</sup>, определяющий устойчивость к ампициллину в клетках *E. coli*; сайты рестрикции находятся в полилинкере в следующих положениях от точки начала репликации плазмидной ДНК:

EcoRI 300 п.о.

Sac I 306 п.о.

Kpn I 312 п.о.

Sma I 316 п.о.

BamH I 321 п.о.

Sal I 333 п.о.

Pst I 339 п.о.

Sph I 345 п.о.

Hind III 351 п.о.

встраивание чужеродных генов может проходить по сайтам рестрикции, содержащихся в полилинкере; емкость встраиваемой ДНК 6 п.о.

RUSSIAN FEDERATION  
RUSSIAN AGENCY FOR PATENTS AND TRADEMARKS  
(ROSPATENT)  
PATENT C1  
NO. 2105064

Int. Cl. <sup>6</sup> :	C 12 N 15/10 15/70
Filing Date:	July 19, 1996
Filing No.:	96114482
Entered into the Register of the Russian Patent Documents:	February 20, 1998, Bulletin No. 5
Priority Date:	July 19, 1996

VECTOR pMT440 WITH POSITIVE SELECTION FOR CLONING OF FOREIGN DNA  
FRAGMENTS

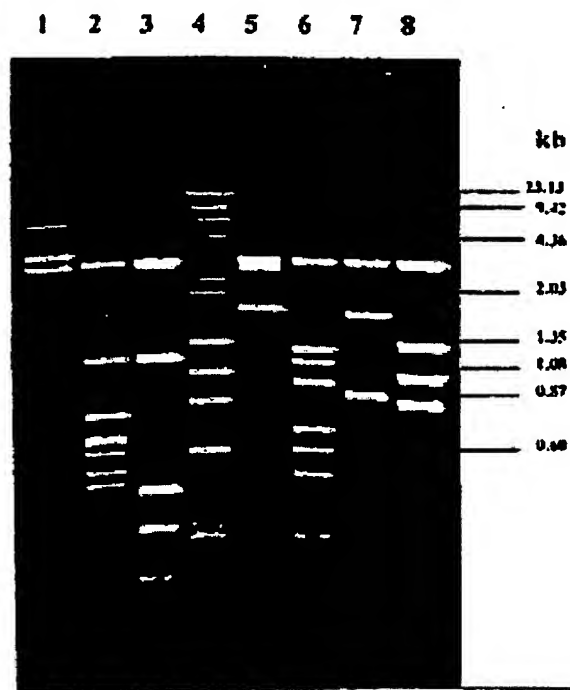
Inventors:	S.M. Deev S. A. Yazynin
Applicant:	V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences

INVENTION SPECIFICATION

Citations:	Advertisement brochure of the company INVITROGEN, Biotechniques, EURO-EDITION, Jan/Feb 1996, page 4.
------------	---

The vector pMT440 is used for positive selective cloning of fragments of foreign DNA in genetic engineering. The vector contains the structural barnase gene, subcloned from *Bacillus amyloliquefaciens* under the control of synthetic tac-promoter; universal polylinker of plasmid pUC19; consisting of 45 bp. incorporated barnase gene instead of valine-36, phoA – signal sequence from *Escherichia coli*; a gene for a specific barnase inhibitor – barstar under its own

promoter; a fragment of plasmid pUC19, including the replication start site ori, gene Amp<sup>r</sup>. Restriction sites are in the following positions from replication start point of plasmid DNA: EcoRI – 300 bp, SacI – 306 bp, KpnI – 312 bp, SmaI – 316 bp, BamHI – 321 bp, SalI – 333 bp, PstI – 339 bp, SphI – 345 bp, HindIII – 351 bp. The size of the vector is 2936 bp, its capacity – 6 kbp. The vector provides positive selection of cloned fragments of foreign DNA in various *E. coli* strains.



This invention, in general, pertains to biotechnology and, in particular, to genetic engineering. The object of the present invention is the vector pMT440, which finds application in cloning of foreign DNA fragments.

For the cloning of foreign DNA and identification or selection of the clones containing recombinant plasmids, there are many available plasmid vector systems. The most well known of these are systems that use  $\beta$ -galactosidase complement, having color identification of clones with an insert [1] and a knockout gene with antibiotic resistance for negative selection [1]. The application of toxins from plasmids ColE1 [2] and ColE3 [3] for direct selection of cloned inserts is well known, but this system is limited to a small number of sites detectable by restriction enzymes and has not gained wide popularity.

The system based on use of an E-gene lysis of phage  $\phi$  X174 [4] is known. A recent publication [5] reported on replacement of this gene by a modified gene containing 10

convenient sites for detection by restriction enzymes and not changing its amino acid sequence, which corrected the former high levels of background clones without an insert.

The vector pKIL18/19 with positive selection, containing the active cytotoxic gene CcdD under the control of lac promoter [6], is known. A product of this gene – protein CcdD – inactivates gyrase in *gyrA*<sup>+</sup> of *E. coli* strains. But insertion of foreign DNA breaks the lethal influence of the gene *ccdB*. The vector can be amplified only in cell strain TOP10F [illegible superscript], which contains *gyrA*462 – a mutation of the gyrase gene.

The vector pZEro™, constructed from pKIL18 [7], is known, and it therefore contains the protruding polylinker for inserts on *ccdB*, T7 and SP6 promoters, direct and reverse sites of M13, origins of a phage f1 and plasmid pUC, a gene resistant to zeocin. The size of the plasmids can be as small as 2.8 KNP.

However, the specified vector has a number of deficiencies, namely, it can be amplified only in certain strains and is characterized by high amounts of background clones because the polylinker is located before a lethal gene instead of inside of it.

The maintenance of highly effective positive selection of cloned fragments of foreign DNA is done on the basis of the invention in various *E. coli* strains.

This problem is solved by the use of the toxic effect of the expression of ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens* (barnase) in *E. coli*. Here we have a selection containing the full multirestriction polylinker plasmid pUC19, placed inside the barnase gene without disturbing the enzymatic activity of the expression enzyme.

The construction of the vector pMT440, designed on the basis of known plasmid pMT416, intended for expression of the highly active ribonuclease barnase, in which the following changes are made, is offered in the present invention: a) internal sites, detectable by the restriction enzymes; EcoRI, HindIII, XbaI, PstI, BamHI are destroyed, and b) instead of valine 36 inside the barnase gene, the universal polylinker from plasmid pUC19 is incorporated.

Vector pMT440 with positive selection for cloning of foreign DNA fragments is 2936 bp in size and contains

Structural barnase gene, subcloned from *Bacillus amyloliquefaciens* under the control of the synthetic tac promoter;

Universal polylinker plasmid pUC19, consisting of 45 bp, incorporated in the barnase gene instead of valine 36;

*phoA* – signal sequence from *E. coli*, which provides secretion of barnase in the periplasm of the bacterial cell;

Gene-specific inhibitor of barnase – barstar, under its own promoter;

Fragment of plasmid pUC19, including replication start site *ori*.

Gene *Amp*<sup>r</sup>, defining ampicillin resistance in *E. coli* cells;

Restriction sites in the vector pMT440, which are in the following positions from the start point of plasmid DNA replication:

EcoRI – 300 bp.

SacI – 306 bp.

KpnI – 312 bp.

SmaI – 316 bp.

BamHI – 321 bp.

Sall – 333 bp.

PstI – 339 bp.

SpHI – 345 bp.

HindIII – 351 bp.;

Embedding of foreign genes can happen on restriction sites contained in the polylinker;  
Capacity of incorporated DNA – 6 kbp.

For the expression of the barstar gene, subcloned in tandem with the barnase gene, in one plasmid, it is necessary to neutralize the lethal effect of barnase synthesis. Without induction of *E. coli* strains bearing  $\text{lacI}^Q$ , the gene for hyperexpression of lac repressor (for example, JM107, XL1-blue, SURE), the plasmid is not lethal, though it secretes significant amounts of barnase. Addition of small amounts of IPTG inducer increases secretion of barnase, but in the full induction with large amounts of inducer, there is a suppression of barstar protection and the cells die. In such strains of *E. coli* as HB101, without the  $\text{lacI}^Q$  gene and in the absence of inducer, the plasmid is lethal. In the barnase gene, instead of the codon for valine 36, the polylinker of the plasmid pUC19 is incorporated. This insert of 19 highly hydrophobic amino acids in an enzyme molecule does not completely disrupt the lethal effect. Plasmid pMT440 is a convenient selective vector for cloning. Intact pMT440 transformed with  $\text{lacI}^Q$ -negative strains does not support growth. However, the bacteria transformed with the plasmids containing the insert survive.

Vector pMT440 is created from the expression plasmid pMT416. For this purpose:

Deletion from it of 5 unique sites recognized by the restriction enzymes (EcoRI, BamHI, XbaI, PstI and HindIII) by means of cleavage, ligation and subclonings as described in [1];

Instead of GTG, the codon for amino acid valine 36, inserted sequence GAATTCCAGTCAAAGCTT coding amino acids Glu-Phe-Gln-Ser-Lys-Leu and containing sites recognized by the restriction enzymes EcoRI (GAATTC) and HindIII (AAGCTT), by means of site-directed mutagenesis. The spacer is 6 nitrogenous bases away.

A six-membered piece between EcoRI and HindIII is replaced on the polylinker of plasmid pUC19 by 45 nucleotides. As a result in plasmid pMT440, the barnase gene codes for 19 additional amino acids instead of one valine-36. The 19 additional amino acids are located far



enough from the active center of the molecule and are mainly hydrophobic. They form an external loop, which does not disturb the native conformation of the enzyme.

Sequence of the structural barnase gene with the insert was checked by sequencing according to Sanger [8].

Example 1. A vector pMT440 as a cloning vector with positive selection.

A library of random Sau3A fragments for the subsequent insertion at a BamHI recognition site, located on the polyI is produced. To make more stringent checks, molar quantities of plasmid vector in 5-10 times exceeding the corresponding quantities of library fragments were used. For cloning, two fractions of fragments were used: in a size approximately from 600-1200 bp. and a size from 2000-4000 bp. After ligation and electroporation transformation in *E. coli*, about 600 colonies in case of smaller inserts were obtained and 40 colonies were obtained with more than 100 ng of vector. A check by hybridization on plates with <sup>32</sup>P oligonucleotide probes showed that 97% of clones do not contain a restored BamHI site in polylinker. Plasmids picked from 7 clones were negative in the hybridization test. All contained inserts and this was confirmed by the results of their treatment with restriction enzymes (drawing).

The drawing shows the results of electrophoresis in 1% agarose gel. The plasmid treated with restriction enzymes EcoRI and HindIII, isolated from the surviving transformants of *E. coli* HB101, are shown.

The plasmid library of *B. amyloliquefaciens* genes was obtained by ligation of plasmid pMT440, treated with BamHI, and fragments of genomic *B. amyloliquefaciens* DNA, treated with Sau3A. The set of fragments was obtained by association of the fractions containing fragments in a size approximately from 2-4 KNP, DNA was taken from four samples, differing in duration of treatment with the restriction enzyme Sau3A. As a standard (the fourth track) 200 pg of phage λ DNA treated with HindIII was used together with phage φX174 DNA treated with HaeIII. A fragment of vector DNA in a size of 2919 KNP is found in all tracks. The subcloned fragments contain from 0 to 9 residues by cleavage with EcoRI and HindIII.

#### Sources of information

1. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. **Molecular cloning (laboratory manual)**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.

2. Ozaki, L. S., Maeda, S., Shimada, K. and Takagi, Y.: A novel ColEI::Tn3 plasmid

vector that allows direct selection of hybrid clones in *E. coli*. *Gene* 8 (1980) 301 - 314.

3. Vernet T., Lau P.C., Narang S.A. and Visentin. A direct-selection vector derived from pColE3-CA38 and adapted for foreign gene expression. *Gene* 34. (1985) 87 - 93.

4. Henrich B and Plapp R. Use of the lysis gene of bacteriophage  $\phi$ X174 for construction of a positive selection vector. *Gene* 42 (1986), 345 -349.

5. Henrich, B., Schmidtberger, B. Positive-selection vector with enhanced lytic potential based on a variant of ( $\phi$ X174 phage gene E. *Gene* 154 (1995) 51 - 54.

6. Bernard P., Gabant P., Bahassi E.M. and Couturier M. Positive-selection vectors using F plasmid *ccdB* killer gene. *Gene* (1994) 71 - 74.

7. Рекламный анонс фирмы INVITROGEN, Biotechniques, EURO-EDITION, Jan/Feb 1996, p. 4.

8. Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972.

#### Claim

Vector pMT440 with positive selection for cloning of fragments of foreign DNA in a size of 2936 bp, containing: a structural barnase gene subcloned from *Bacillus amyloliquefaciens* under the control of the synthetic tacpromoter; universal polylinker plasmid pUC19, consisting of the 45 bp barnase gene incorporated instead of valine 36; *phoA* signal sequence of *Escherichia coli*, which provides secretion of barnase in the periplasm of a bacterial cell; a gene-specific inhibitor of barnase-barstar, under its own promoter; a fragment plasmid pUC19, including an initiation site – ori; gene *Amp<sup>r</sup>*, defining ampicillin resistance in *E. coli* cells; restriction sites are in the polylinker in the following positions from a point at the beginning of plasmid DNA.

EcoRI – 300 bp.

SacI – 306 bp.

KpnI – 312 bp.

SmaI – 316 bp.

BamHI – 321 bp.

SalI – 333 bp.

PstI – 339 bp.

SphI – 345 bp.

HindIII – 351 bp.;

Embedding of foreign genes can be on restriction sites contained in the polylinker;

Capacity of incorporated DNA – 6 bp [sic; kbp].

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**